

成熟ラット肝細胞の初代単層培養法を用いた リポ蛋白代謝に関する研究：高比重リポ蛋白 (HDL₃) および Apo A-I の合成について

金沢大学医学部第2内科学講座（主任：竹田亮祐教授）

山 田 志 郎

（昭和53年10月31日受付）

本論文の一部は、第50回日本生化学会大会（昭和52年10月、東京）、第10回日本動脈硬化学会総会（昭和53年5月、長崎）、第11回国際老年学会議（昭和53年8月、東京）で発表した。

従来、冠動脈硬化症の発症進展とリポ蛋白との関係については血中のβリポ蛋白もしくは低比重リポ蛋白（low density lipoprotein, LDL）が冠動脈硬化の成因に重要な役割を演じている事が多数の研究者によって強調されてきた¹⁾²⁾。一方、Millerらが血漿の高比重リポ蛋白（high density lipoprotein, HDL）コレステロールと体コレステロールプールとの間に負の相関がみられ、HDLが末梢より肝へのコレステロール輸送に関与している可能性を報告³⁾して以来、HDLの抗動脈硬化作用について興味ある報告が相次いでなされた。しかし、HDLの生体内での代謝およびその調節については不明な点が多い。

HDLの合成に関してはRaddingらが肝スライスを用いて¹⁴C-leucineのリポ蛋白への取り込みを報告しているが⁴⁾、近年、肝灌流法を利用してHDLの合成を検討する方法が主として用いられている^{15)~19)}。しかし、肝灌流法は対象とする肝細胞の不均一性、すなわち肝実質細胞以外のクーパー細胞等の影響が問題となり¹⁰⁾、さらに、数時間しかその特異的肝機能を維持しえない難点があり、約13.5時間と長い半減期¹¹⁾をもつHDLの主たるアポ蛋白であるApo A-Iの合成や分解の機序およびその調節機構を解明するには不十分と考えられた。そこで著者は長時間にわたり観察可能な実験モデルとして成熟ラット肝細胞の初代単層培養法を確立し、この培養肝実質細胞を用いてHDL₃特にその主たるアポ蛋白Apo A-Iの合成について検討した。

材料および方法

1. 肝実質細胞遊離法および培養法について (Fig.1)

24時間絶食後のSprague-Dawley雄ラット（体重250～300g）をペントバルビタール（Nembutal sodium, Abott Lab.）麻酔下に開腹し、門脈より0.05%コラゲナーゼ（Type II, Worthington Biochem. Corp.）を含むKrebs-Henseleit bicarbonate buffer（KHB）で肝を灌流するBerryとFriendの方法¹²⁾に準じた中井らの変法¹³⁾にて肝細胞遊離を行なった。このKHBはあらかじめ5%CO₂/95%O₂の混合ガスで飽和し、37°C pH7.4に調整し、Millipore filter

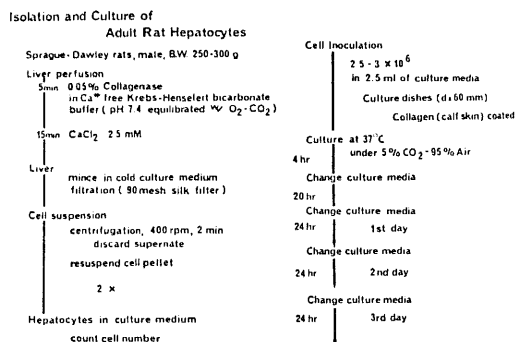


Fig. 1. Isolation and culture of adult rat liver parenchymal cells.

Synthesis of HDL₃ (or Apo A-I) by rat hepatocytes in primary monolayer culture.
Shiro Yamada, M. D. The Second Department of Internal Medicine (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

(pore size : 0.22 μ m, Millipore Ltd.)で滅菌濾過したものを使用した。肝灌流約 20 分後コラゲナーゼにより軟化した肝をラット腹腔内より摘出し、培養液 HI/WO₅/BA₂₀₀₀ (International Scientific Ind.) 中で細胞を遊離し、約 90 メッシュの絹フィルターにて濾過した。濾液を約 400rpm 2 分間遠心、洗浄を繰り返して、約 40 ~ 70 ml の肝実質細胞の浮遊液を作る。この浮遊液中の細胞数はトリパンブルーで染色し、非染色細胞を血算盤にて計測する。約 $2.5 \sim 3 \times 10^6$ 個の遊離細胞を前もってコラーゲン (Type IV, calf skin, Sigma Chem. Co.) をコーティングした培養皿 (直径 60mm, Falcon Co.) を用いて 14 C 2.5 ml の HI/WO₅/BA₂₀₀₀ 中、37°C で湿潤した 5% CO₂/95% air の気相下に培養を開始する。培養液は培養 4 時間後、次いで 20 時間後、以後 24 時間毎に交換した。これらの操作はすべて無菌的条件下で行なった。以下の実験は主に 24 時間後の培養肝細胞を用い形態学的、生化学的検討を行なった。

2. 培養肝実質細胞の形態学的、生化学的特徴について

1) 形態学的検査

培養 24, 48, および 72 時間後の肝細胞について光学顕微鏡にて形態学的検討を行なった。さらに 4% glutar aldehyde, 1% osmium tetroxide にて固定、Karnovsky's lead hydroxide 処理した。24 時間後の培養肝細胞の微細構造を日立 HU-11B 電子顕微鏡にて観察した。

2) 培養肝細胞によるブドウ糖合成

24 時間培養後の単層肝細胞を 10mM lactate (lithium salt, Calbiochem, Co.), 1mM pyruvate (Sigma Chem. Co.) および 2.6 μ M glucagon (Lilly Res. Lab.) を含む KHB 中で 37°C, 5% CO₂/95% air の気相下にロッカー・インキュベーター (Bellco Glass Inc.) を使用して 2 時間迄インキュベートし、メジウム中に放出されたグルコースを hexokinase および glucose-6-phosphate dehydrogenase (Boehringer Mannheim Biochem.) を用いた酵素法にて測定した¹⁵⁾。一方、対照実験としてグルカゴンのみとインキュベートした培養肝細胞からグリコーゲン分解の結果放出されたブドウ糖量を測定し、この値を差し引いて真の糖新生能を算出した。単位は Lowry らの方法¹⁶⁾により定量した細胞蛋白あたりのグルコース nM/mg cell protein (/hr) として計算した。

3) dexamethasone (DXM) による tyrosine aminotransferase (TAT) 活性の誘導

培養 24 時間後の単層培養肝細胞を新鮮培養液で洗

浄後、濃度 10^{-5} M DXM の培養液 HI/WO₅/BA₂₀₀₀ 中で 6 時間 37°C, 5% CO₂/95% air の気相下に培養し細胞内の TAT 活性を Spencer と Gelharter らの方法¹⁷⁾で測定し、DXM を含まない培養液で培養した対照の肝細胞内の TAT 活性と比較した。なお本酵素活性は 37°C, 1 分間に 1nmole の p-hydroxy-phenyl pyruvate の生成に要する酵素量を 1mU とし、細胞蛋白 mg あたりの酵素量として算出した。

4) 非代謝性アミノ酸, α -aminoisobutyric acid (AIB) の細胞膜輸送

培養 24 時間後の肝細胞について、 α -[1- 14 C]-AIB (New England Nuclear Corp.) を培養液に加え、経時的に 24 時間迄細胞内外の AIB 濃度比を測定し、培養肝細胞膜のアミノ酸輸送を Kletzen らの方法¹⁸⁾に従って検討した。また DXM のアミノ酸輸送に及ぼす影響を検討するため 10^{-5} M DXM を培養液に加え同様に AIB 比を測定し対照と比較した。この AIB 濃度比 (AIB distribution ratio) を算出するための細胞内 water space は非代謝性ブドウ糖, 3-O-methyl 14 C-glucose (New England Nuclear Corp.) を KHB 中に加え細胞内外の methylglucose が平衡状態に達した値から、2.455 μ l/mg cell protein と計算された (Fig.2)¹⁹⁾。

5) 培養肝細胞によるアルブミン合成

24 時間後の培養肝細胞より培養液中に合成分泌されるアルブミンを 24 時間迄経時的に測定した。また蛋白合成阻害剤 cycloheximide (Sigma Chem. Co.) を培養液に加え、培養肝細胞のアルブミン合成に対する影響を検討した。アルブミンの測定には Laurell の定量的免疫電気泳動法²⁰⁾の改良法²¹⁾を利用した。使用

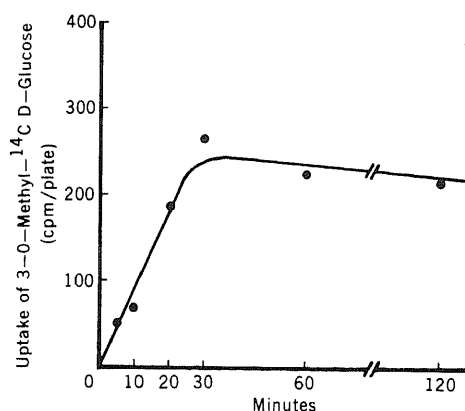


Fig. 2. The uptake of 14 C-methylglucose by adult rat hepatocytes in culture for 24 hours.

した抗ラット・アルブミン抗体はラット・アルブミン (Fraction V, fatty acid free, Sigma Chem. Co.) 4mg を等量の Freund's complete adjuvant (Difco Lab. Inc.) とともに家兎腹腔内に1週間毎に4~5回免疫することにより得られた。しかし、この抗体は免疫学的に培養液の組成であるウシ・アルブミンとも反応するために予めウシ・アルブミン (Pentex Fraction V, fatty acid free, Miles Lab. Inc.) と混和遠心することにより吸収除去し、ラット・アルブミンに対する特異的抗体を作成した。

3. 培養肝細胞による HDL₃ または Apo A-I の合成について

1) ラット血清 HDL₃ 分離法 (Fig.3) および抗ラット HDL₃ 抗体の作成

24時間絶食後の Sprague-Dawley ラット (雄) の腹部大動脈より採血し、4°C にて遠心分離した血清に KBr を加え、密度 $d = 1.110$ g/ml に調整し、 $105,000 \times g$, 22時間遠心した。遠心後 tube slicer を用いて下層を分取し、この分画に KBr を加え、密度を $d = 1.210$ g/ml に再調整し、さらに $105,000 \times g$ 44時間遠心を行い、上層すなわち密度 $1.110 < d < 1.210$ g/ml の HDL₃ 分画を分離した。この分画中のアルブミンの混在を除くために密度 $d = 1.210$ g/ml の NaCl・KBr 液にて超遠心を繰り返した。4°C 下に再溜水、または 3mM EDTA を含む 0.154M NaCl (pH7.5) に対して透析を行い、分離したラット HDL₃ を Freund's complete adjuvant と混和 (1:1 v/v) し、週1回 HDL₃ の蛋白量として 2mg 宛家兎腹腔内に投与し、4週後に心穿刺により家兎より採血し抗ラット HDL₃ 家兎血清を得た。

2) 抗ラット HDL₃ 血清の特異性について

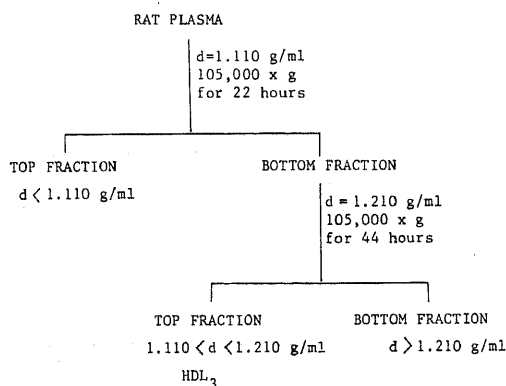


Fig. 3. Isolation of high density lipoprotein (HDL₃) by ultracentrifugation.

得られた抗ラット HDL₃ 血清 (Anti-rat HDL₃) の特異性を確かめるため、この抗 HDL₃ 血清とラット血清より超遠心法にて分離した超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein VLDL, $d < 1.006$ g/ml) および低比重リポ蛋白 (LDL₂, $1.019 < d < 1.050$ g/ml) を 1% agarose を用いて Ouchterlony の免疫拡散法により検討した。

さらに、この抗ラット HDL₃ 血清が HDL₃ を構成するいずれのアポ蛋白に対する免疫学的特異性を有するかを検討した。すなわち、超遠心法により得られたラット HDL₃ は Scanu の方法²²⁾に従い、エタノール・エチルエーテルで完全脱脂し Apo HDL₃ を得た。この Apo HDL₃ を Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chem. Inc.) のカラム・クロマトグラフィー (カラムサイズ: 2.5×90 cm) により、8M urea を含む 0.01M Tris buffer (pH8.0) で溶出し、各分画の蛋白量を 280nm の吸光度で測定した。溶出パターンは peak I, II および III の 3 峰を形成し、各 peak 相当部分を Alaupovic らの方法^{23,24)}に従って 8M urea を含む 7% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて分離した (Fig.4)。泳動後 polyacrylamide gel を縦断 2 分割し、アガロース・ゲルに埋め込み、抗ラット HDL₃ 血清と免疫拡散法により反応させ、いずれのアポ蛋白泳動帯に免疫沈降線が形成されるか観察した。

3) ラット培養肝細胞による HDL₃ または Apo A-I の合成について

培養 4 時間後の肝細胞を新鮮培養液で洗浄し、その後前述の条件下で 20 時間培養を続け、その培養液につ

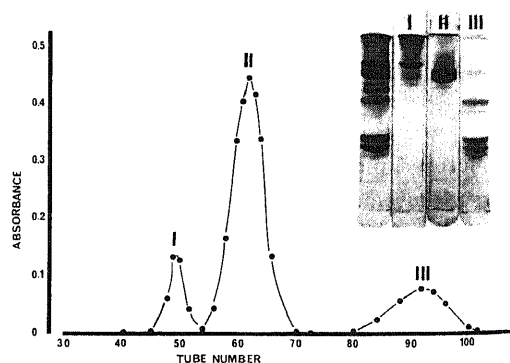


Fig. 4. Gel filtration of totally delipidized rat HDL₃ (Apo HDL₃) on column of Sephadex G-100. The insert shows polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Apo HDL₃ (the left), peak I, II and III.

いて以下の検討を行なった。培養液を集め $2000 \times g$ で15分間遠心し、死滅した細胞等を除去し、上清を ultrafiltration (Amicon PM10, Amicon Co.) で約10倍に濃縮した。この濃縮培養液を用いて抗 HDL₃ 血清との免疫反応を1%アガロースを用いた免疫拡散法および免疫電気泳動法にて検討した。

またブールした培養液より HDL₃ 分画 ($1.110 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) を前述の超遠心法にて分離し、Scanuの方法で完全脱脂した Apo HDL₃ を8M ureaを用いる7% PAGEにて分析した。

成 績

1. 培養細胞について

1) 培養肝細胞の形態学的特徴について

培養24時間後の肝細胞は隣り合った細胞が互いに接し均一な単層を形成し (Fig.5), その細胞間隙には正常肝組織像の如く微細胆管やデスモゾーム等が電子顕微鏡で明瞭に観察された。また細胞内のミトコンドリア, ゴルジ装置, 粗面および滑面小胞体, さらに細胞核等細胞の微細構造はよく維持されていた (Fig.6)。電子顕微鏡下に観察されたクーパー細胞は全細胞数の1%以下であった。また48, 72時間後の培養細胞の形態も24時間後の細胞と比較しうる程よく維持されていた。

2) ブドウ糖合成について (Fig.7)

培養24時間の肝細胞のグルカゴン存在下での10mM lactate と1mM pyruvate からのグルコース放出は $384 \text{ nmoles/mg cell protein/hr}$ であった。しかし、この培養条件下での培養細胞は飢餓状態とは考え難く、メジウム中に放出されたグルコースの一部はグリコーゲン分解によるものを含むと考えられる。この影響を除くためグルカゴンとのみインキュベートし

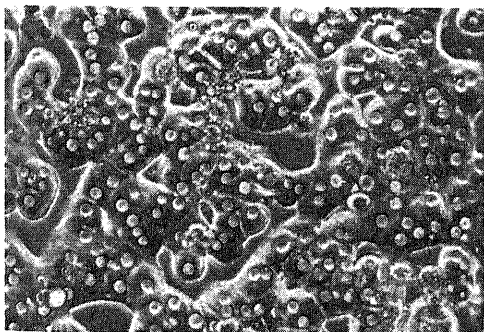


Fig. 5. Light microscopic photograph of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture 24 hours postinoculation ($\times 200$).

た肝細胞より放出されたグルコース量を測定し、全グルコース量より差引き真の糖新生能を算出した。これより24時間培養肝細胞の pyruvate, lactate からグルコース新生能は $179.5 \text{ nmoles/mg cell protein/hr}$ であった。しかし、培養48時間後の肝細胞では糖新



Fig. 6. Electron micrograph of cultured rat hepatocytes 24 hours postinoculation ($\times 31250$).

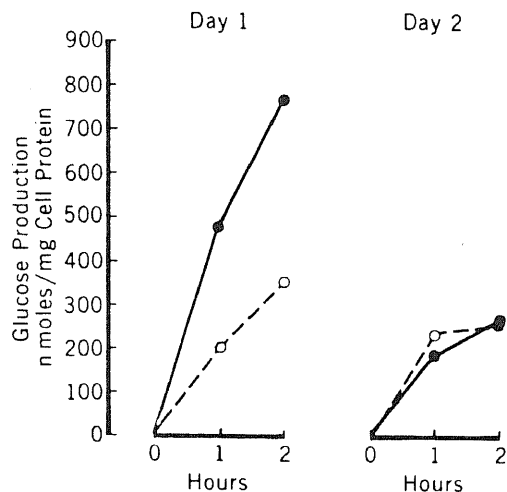


Fig. 7. Gluconeogenesis by rat liver parenchymal cells in culture for 24 and 48 hours. Cultured hepatocytes were incubated in Krebs Henseleit bicarbonate buffer (pH 7.4) containing $2.6 \mu\text{M}$ glucagon with (●) or without 10mM lactate and 1mM pyruvate (○.....○).

生は殆ど認められなかった。

3) DXM による TAT 誘導について (Fig.8)

培養 24 時間後の肝細胞 (培養第 1 日) を 10^{-5} M DXM を加えた培養液中で、さらに 6 時間培養を続けた後細胞内の TAT 活性を測定した。DXM による TAT 誘導は 43.8 mU/mg cell protein であり、対照に比して約 4 倍の酵素活性が認められた。この TAT 誘導のレベルは培養 2 日目 (培養 48 時間後) の細胞においても維持されていたが、第 3 日目の培養細胞では第 1, 2 日目の TAT 誘導レベルの約 30 % にまで低下した。しかし、この DXM による誘導の現象は培養第 6 日目の肝細胞においても観察された。

4) 14 C-AIB の細胞膜輸送について

培養肝細胞の細胞膜機能をアミノ酸の能動輸送を指標として検討した。培養 24 時間後の肝細胞を用いた非代謝性アミノ酸 AIB の細胞内への取り込み、およびそのアミノ酸輸送に及ぼす DXM の影響について検索した。培養時間の経過とともに AIB 比 (AIB distribution ratio) の上昇、すなわち細胞内への AIB の取り込みの増加が観察された (Fig.9)。DXM の AIB 輸送に対する影響は培養初期 3 時間程度では殆ど認められず、対照との間に差がなかったが培養時間の経過

つれ AIB は対照に比べて増加し、24 時間後には 11.5 と対照の約 20 % の増加をみた。

5) アルブミン合成について

培養 24 時間後の細胞のアルブミン合成についてメジウム中へ細胞から合成分泌されたアルブミン量を Laurell の定量的免疫電気泳動法にて定量し検討した。Fig.10 はラット・アルブミン (Fraction V, fatty acid free, Sigma Chem. Co.) の標準液と抗ラット・アルブミン抗体との定量的免疫電気泳動による沈降線、いわゆる“ロケット”の高さとアルブミン濃度との関係を示したもので両者の間には有意の直線関係が認められた ($r = 0.999$)。

培養肝細胞のアルブミン合成は Fig.11 の如く時間とともに直線的に増加し、そのアルブミン合成は $1.56 \mu\text{g}/\text{mg cell protein}/\text{hr}$ であった。一方、培養液中に cycloheximide を加えた実験では培養肝細胞によるアルブミン合成は完全に阻害された (Fig.11)。

2. 培養肝細胞による HDL₃ または Apo A-I の合成

1) 抗ラット HDL₃ 血清の特異性

ラット血清から超遠心法により分離した HDL₃ を家兎に免疫して得られた抗ラット HDL₃ 血清と、超遠心法により分離したラット・リポ蛋白分画 VLDL ($d < 1.006 \text{ g/ml}$), LDL₂ ($1.019 < d < 1.050 \text{ g/ml}$) との間には免疫反応を示さず (Fig.12), ラット HDL₃ に対し

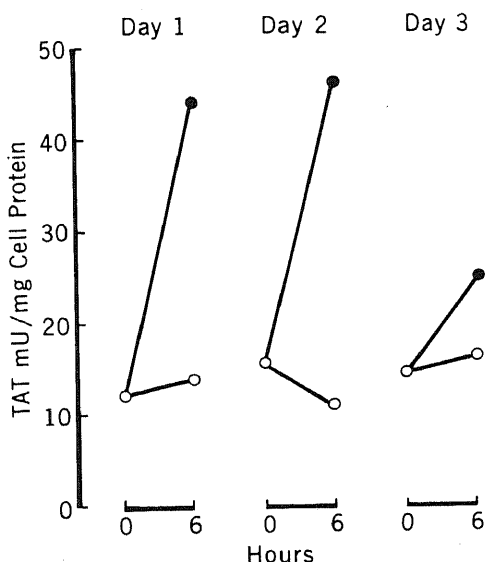


Fig. 8. Induction of tyrosine aminotransferase activity by dexamethasone in cultured rat hepatocytes 24, 48 and 72 hours postinoculation. Hepatocytes were cultured with (●—●) or without 10^{-5} M dexamethasone (○—○).

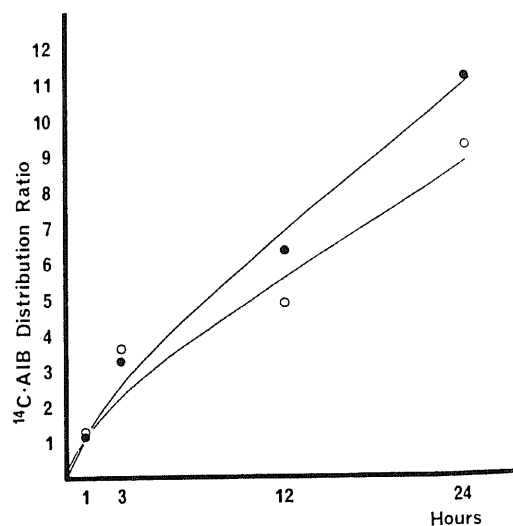


Fig. 9. The cultured heptocytes were incubated in the media containing 14 C- α -aminoisobutyric acid (AIB) with (○—○) or without 10^{-5} M dexamethasone (●—●).

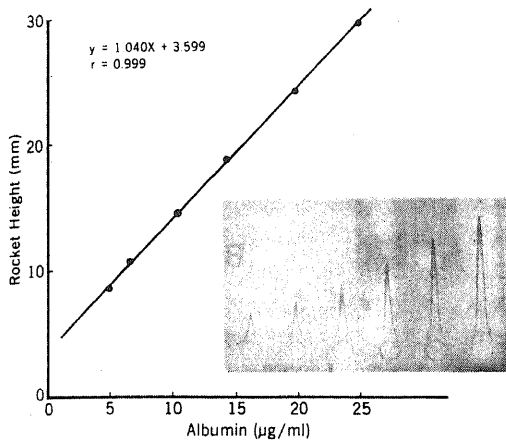


Fig. 10. Linear relationship between rocket height (mm) and albumin concentration ($\mu\text{g/ml}$). Typical rockets are illustrated.

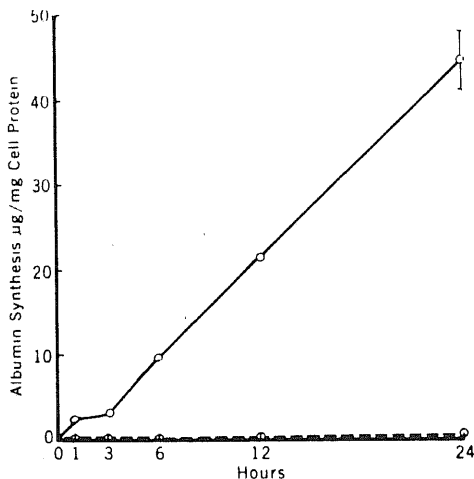


Fig. 11. Time course of albumin synthesis by cultured rat hepatocytes 24 hours postinoculation (○—○). Albumin synthesis was completely blocked by cycloheximide (○-----○).

での明瞭な免疫沈降線を形成することが免疫電気泳動法で確認された (Fig. 12). また、この抗 HDL₃ 血清はラット・アルブミンや培養液組成であるウシ・アルブミンとの間にも免疫反応を示さなかった。

さらに、ラット Apo HDL₃ を Sephadex G-100 カラム・クロマトグラフィーにより分離して得られた peak II の PAGE では明瞭な Apo A-I 帯が、また peak III には Apo A-II, Apo C と推定される各泳動帯が確認された。また peak I には Apo E および

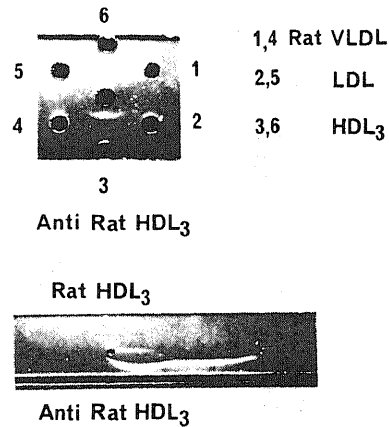


Fig. 12. Anti-rat HDL₃ reacted with HDL₃, and did not react with VLDL and LDL₂ by immunodiffusion (top) and immunoelectrophoresis (bottom).

Apo A-I のポリマーと推定される泳動帯が PAGE にて観察された。この peak I, II および III の PAGE ゲルを縦断 2 分割し、アガロース・ゲルに埋め込み抗 HDL₃ 血清を用いた免疫拡散法により検討を加えたが、Apo A-I 帯にのみ一致した免疫沈降線が形成され他のアポ蛋白帯とは免疫反応が認められなかった (Fig. 13)。

これらの結果より、用いた抗ラット HDL₃ 血清は少なくとも Apo B, Apo C, Apo A-II とは免疫反応を示さず、Apo A-I に対する特異的抗血清と考えた。

2) 培養肝細胞の HDL₃ または Apo A-I の合成について

ラット肝細胞を 20 時間培養し、その培養液を約 10 倍に濃縮し、抗 HDL₃ 血清を用いて免疫学的検討を行った。濃縮培養液と抗 HDL₃ 血清の間には明瞭な免疫沈降線が確認された (Fig. 14) が、免疫電気泳動法での沈降線の移動度は対照のラット HDL₃ との間に見られる沈降線の移動度とは若干異なる (Fig. 14)。この免疫沈降線は肝細胞により合成されたラット・アルブミンや、培養液中のウシ・アルブミンとの免疫反応とは明らかに異なり、また使用した抗ラット HDL₃ 血清の特異性より考えて培養肝細胞により合成分泌された Apo A-I との免疫沈降線と考えられた。

培養肝細胞の 20 時間培養液をプールし、超速心法により分離した HDL₃ 分画 ($1.110 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) を完全脱脂して得た Apo HDL₃ の PAGE を対照のラット血清 Apo HDL₃ の PAGE と比較した。対照のラ

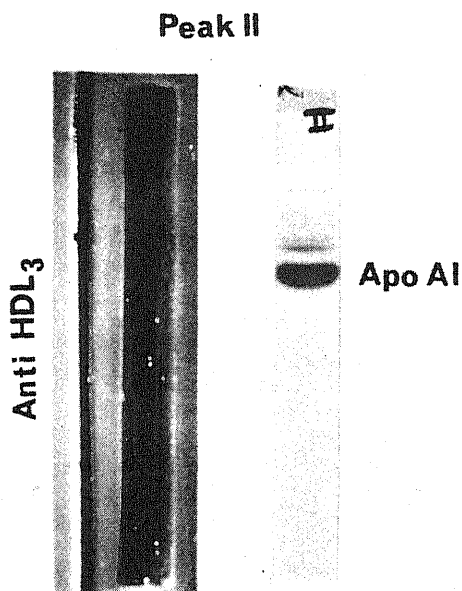


Fig. 13. Double immunodiffusion analyses of peak II from Sephadex G-100 column chromatography of Apo HDL₃, with anti-rat HDL₃.

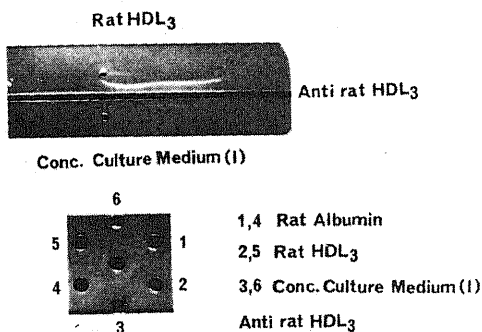


Fig. 14. Immunelectrophoresis and double immunodiffusion of concentrated culture media with anti rat HDL₃. The culture media in which rat hepatocytes were cultured for 20 hours were concentrated by ultrafiltration.

ット血清 Apo HDL₃ の各アポ蛋白の移動度に一致した泳動帯(主として Apo A-I および Apo C)が培養液より分離した Apo HDL₃ の PAGE で観察された (Fig.15).

考 察

1. 成熟ラット肝細胞の初代単層培養法

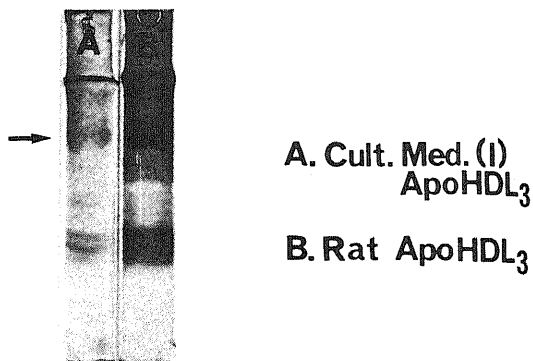


Fig. 15. Seven percent polyacrylamide gel electrophoresis of totally delipidized HDL₃ (Apo HDL₃) obtained from culture media (A) and rat serum (B). Apo A-I band is indicated by an arrow.

1) 肝細胞培養法について

はじめに触れた如く、肝臓を用いた代謝実験には従来、肝灌流法^{5)~9)25)26)}、肝スライス法⁴⁾²⁷⁾または遊離肝細胞法¹⁾²⁾¹³⁾²⁸⁾²⁹⁾等が広く利用され、またリポ蛋白代謝の研究法として、近年、肝灌流法を用いた実験成績が報告されている^{5)~9)}。しかし、肝灌流法や肝スライス法ではリポ蛋白代謝の研究上肝細胞の不均一性、特に網内系細胞であるクーパー細胞の影響が無視できず、その特異的肝機能が数時間しか維持しえない難点とあわせリポ蛋白代謝を検討するには不適当な実験系と考えられる。また遊離肝細胞法では均一な細胞群を使用し同一の条件下の代謝状態を比較しようが、¹⁴C-methyl glucose の取り込みの成績から、培養肝細胞とは細胞膜透過性が明らかに異なる事実が報告され、細胞の遊離過程における細胞膜障害が示唆されている¹⁸⁾。この膜障害の影響を除くためにメジウム中にアルブミン等の添加が試みられているが¹³⁾、この遊離肝細胞法は特に3時間以上の長時間の実験には不適当と考えられた。

培養肝細胞を各種代謝実験に利用しようとする試みは1932年 Gey による回転培養法の報告にはじまる³⁰⁾。しかし、従来主として、Chang のヒト肝細胞株³¹⁾、肝癌細胞株を用いた実験成績の報告が多い³²⁾。しかし、これらは必ずしも正常な肝細胞と比較し得る代謝状態を維持しているとは考え難く、正常な成熟肝細胞の特異的機能をすべて保持している肝細胞培養株の樹立は現在までなされていない。このため、長時間の成熟肝細胞の研究には初代培養肝細胞が主に利用されている。しかし、初代培養法であっても、ラット胎児肝

を使用する場合 glucose 6-phosphate dehydrogenase 活性³³⁾や胎児性 α -fetoprotein の合成³⁴⁾等の如く、成熟ラット肝細胞とは明らかに異なる代謝系が報告されている。次に、Jeejeebhoyらは浮遊肝細胞培養法を用い、成熟ラット肝細胞に対するホルモンの影響を報告している³⁵⁾が、大量の細胞を同時に培養維持する方法としての長所はあるが、本来、肝細胞は血球細胞とは異なり細胞間相互の依存性はつよく³⁶⁾、肝細胞が浮遊液中に存在することは非生理的状態と考えられる。これは培養時間の経過とともに、肝細胞膜からの Pseudopodia 形成の現象³⁷⁾からも示唆される。

以上より、成熟ラット肝細胞の初代単層培養法はこれまで述べてきた各実験法の欠点を補ないうる利点を具えていると考えられる。

2) 肝細胞遊離法について

肝実質細胞の遊離には従来、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼやトリプシン等の酵素を含む灌流液による肝灌流法が基本的に用いられているが、その灌流条件は細胞の形態や機能に著しく影響するため、これらの基本的条件の検討は極めて重要と考えられる。著者は、基本的には Berry と Friend の方法¹²⁾に準じて行なったがコラゲナーゼのみを用いてヒアルロニダーゼを使用しない中井らの改良法¹³⁾を使用した。本法では体重 250 ~ 300g の Sprague Dawley の成熟ラット肝より、平均 $8 \sim 10 \times 10^8$ 個の肝実質細胞を常時得る事が可能である。遊離後の肝細胞の生存率は 0.2 % trypan blue による非染色率も 95 ~ 98 % と良好な結果がえられた。電子顕微鏡による観察にても細胞膜および細胞の微細構造がよく保持されていた。また、lactate, pyruvate からの糖新生も認められ、クーパー細胞の混入も 1 % 以下であり、本法はきわめて満足すべき肝実質細胞遊離法と考えられた。

3) 肝細胞培養条件について

成熟ラット肝細胞の初代単層培養では、現在まで多くの研究者により種々の培養液について検討がなされてきた^{38)~42)}。培養細胞を維持していくために、また培養細胞の培養皿底への付着率 (plating efficiency: PE) を増加させるために、ウシ胎児血清等が培養液に添加されている。しかし培養液中に加えられた血清の細胞の代謝への影響は不明で、特に本研究の目的とするリポ蛋白代謝を検討するには加えられた血清中のリポ蛋白の影響は無視しえないと考えられた。このため Bonney らにより用いられている無血清培養液 HI/WO₅/BA₂₀₀₀³⁸⁾⁴³⁾を第1選択とし、肝細胞の初代培養に使用されている Leibovitz-15⁴⁴⁾、および Ham F-12⁴⁵⁾培養液と比較検討した。ただ、培養初期 24 時間の

み Leibovitz 15, Ham F-12 に 10 % ウシ胎児血清 (International Scientific Ind.) を加え、以後無血清状態とする Lin と Snodgrass の方法¹⁴⁾に従い、遊離肝細胞を培養した。37°C, 5 % CO₂/95 % air の気相下に肝細胞を培養したが、Leibovitz-15 は無 bicarbonate buffer で緩衝力が弱いので、28mM HEPES (N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-Ethanesulfonic acid, Sigma Chem. Co.) を加えた。また、いずれの培養液にも抗生物質として Gentamicin (50 μ g/ml, Schering Corp.) を加え、24 時間後の培養肝細胞を光学顕微鏡を用いて形態学的検討を行なった。Ham F-12 中では不明瞭な構造の培養細胞集塊が多数観察され、肝細胞の単層形成が悪く、極めて低い PE が観察された。これに対して、Leibovitz-15, HI/WO₅/BA₂₀₀₀ では細胞構造の比較的明瞭な多角形細胞の単層が形成され、特に HI/WO₅/BA₂₀₀₀ の培養肝細胞は多数の 2 核細胞の存在が観察されたが、その高い PE、均一な細胞群、細胞の微細構造がよく維持されている等、また代謝性アミノ酸 AIB の膜透過性、さらにアルブミンの合成等についての成績からも HI/WO₅/BA₂₀₀₀ の培養液としての優位性が確認され、本実験では以降培養液として HI/WO₅/BA₂₀₀₀ を使用した。

HI/WO₅/BA₂₀₀₀ は、1972 年 Morrison と Jenkin が mouse L cell の培養のために Waymouth MB 752/1 を基本として、オレイン酸 (5mg/L) およびウシ・アルブミン (2000mg/L) を加え改良したものである⁴³⁾。この培養液の特徴として、高濃度グルコース (5000mg/L) を含んでいるが、この高濃度グルコースは培養肝細胞のグリコーゲン分解を抑制し、その結果、細胞の autophagocytosis を防止し細胞の微細構造をよく維持する作用があると考えられている⁴⁶⁾。

PE を増加させるために、Bissell らはラット肝を予め部分切除し、その後の再生肝を用いている。しかし、この方法ではアルブミン合成の低下や、DNA 合成の変化があり、これは再生肝細胞が正常代謝状態にあるとは考え難い事を示唆している³⁹⁾。そのため著者は、Lin と Snodgrass の方法¹⁴⁾に準じてウシ・コラーゲン (calf skin collagen) をコーティングしたプラスチック培養皿を使用したところ、コラーゲン処理しない場合の 1.5 ~ 2 倍の PE の増加が認められた。

培養細胞と培養液量の関係については、培養液の深さが増すにつれ、培養時間の経過とともに、培養細胞数は幾何級数的に減少した。これは培養液の深さが増すにつれ、空気と培養液との間の O₂・CO₂ の交換および拡散が不充分となり、細胞呼吸の障害がおこるためと考えられた。37°C, 湿潤した 5 % CO₂/95 % air

の気相下では、直径60mmの培養皿を用い、 $2.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 個の肝細胞を2.5 mlのHI/WO₅/BA₂₀₀₀中で培養する条件が至適と考えられた。当初、培養24時間毎に培養液を交換していたが、培養細胞が培養皿に附着する4時間後に新鮮な培養液と交換することにより、さらに良好な培養肝細胞を得ることができた。

3) 培養肝細胞の代謝機能について

グルコース合成能、ステロイドによる肝細胞のTAT誘導、アルブミン合成等は特異的肝機能として広く認められている。DXMによるTAT誘導は第1、2日目の培養肝細胞でよく維持され、少なくとも培養24～48時間の肝細胞では生体におけると同様の酵素誘導がみとめられた。また、細胞膜のアミノ酸輸送については、アラニンと同様A systemによる⁴⁷⁾と考えられている非代謝性アミノ酸、AIBの細胞内への取り込みに対するステロイドの影響についての成績から、ステロイドにより促進される⁴⁸⁾、または不変で⁴⁹⁾あると一致した見解が得られていない。この不一致の理由は、AIBの取り込みが2～3時間程度しか検討されていなかったためと考えられ、著者の長時間の実験による培養肝細胞では、DXMによりAIBの細胞内取り込みは亢進すると考えられた。従来報告に比して細胞内へのAIB取り込みが低い、細胞を長時間維持するために用いた培養液中の他のアミノ酸の影響等、実験的条件の差によるものと考えられた。

24時間培養肝細胞により、アルブミンの合成およびメジウム中への分泌が観察されたが、このアルブミンは細胞内に貯蔵されていたアルブミンが細胞の培養過程において生じた細胞の変性ないし細胞膜障害により培養液中に漏出した可能性も考えられた。しかし、cycloheximideを培養液に加えた際に、培養液中のアルブミン増加が完全に阻止された事実より、培養液中のアルブミンは明らかに培養肝細胞により新しく合成・分泌されたものと考えられた。

以上をまとめると、無血清培養液HI/WO₅/BA₂₀₀₀中で、24時間培養した成熟ラット肝細胞は形態学的にも、グルコース合成、ステロイドによるTAT誘導、アルブミン合成等、特異的肝機能をよく維持している。特に、培養24～48時間までの肝細胞は、アミノ酸の輸送の面からも、本来の細胞膜機能をよく維持している事が確認された。

2. 高比重リポ蛋白(HDL₂)の合成

1) HDLの抗動脈硬化作用について

近年、リポ蛋白と冠動脈硬化症との関連を研究する上の新しい考え方として、HDLの抗動脈硬化作用の可能性がMillerらによって示唆³⁾され、これを支持す

る多くの報告が相次いでいる。Framingham study⁵⁰⁾、Tromsø study⁵¹⁾等の疫学調査でもHDL・コレステロールと冠動脈硬化症の発生頻度との間に負の相関が報告されている⁵²⁾。一方、血中HDLの高い家族性高 α リポ蛋白血症では冠動脈硬化症が少なく、平均余命が長いとの報告や⁵³⁾⁵⁴⁾、さらに、大動脈平滑筋細胞や⁵⁵⁾ヒト培養線維芽細胞を用いた実験では、細胞のLDLの取り込みがHDLにより阻害されるとする事実や⁵⁶⁾、大動脈壁よりコレステロールのHDLへの移行がHDLの濃度の上昇につれ亢進する⁵⁷⁾等、臨床的、および、実験的成績からもHDLの抗動脈硬化作用が示唆されている。しかし、HDLの抗動脈硬化作用の機序やHDLの代謝調節については未だ不明の点が多く、協同研究者の中井は以前よりHDLの主たるアポ蛋白、Apo A-Iが肝で異化され、その過程に細胞内のライソゾームが重要な役割を演じている事をすでに報告してきた¹³⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾。

今回、HDLの合成面、特にApo A-Iに注目し無血清培養液を使用した培養ラット肝細胞法を確立し、その合成に関して検討を試みた。

2) HDLおよびアポ蛋白について

高比重リポ蛋白(HDL)とは、動物またはヒトの血清または血漿から超遠心法にて分離されるリポ蛋白で、その密度は、 $1.063 < d < 1.210$ g/mlと定義されている⁶⁰⁾。さらに、この分画は密度 $1.063 < d < 1.110$ g/mlのHDL₂、 $1.110 < d < 1.210$ g/mlのHDL₃の亜分画に分類されている⁶¹⁾。HDLは他のリポ蛋白VLDL、LDL等と同様、脂質・蛋白複合体であり、リン脂質、遊離型およびエステル型コレステロール、トリグリセリド、アポ蛋白と呼ばれる蛋白質、および少量の糖質より構成されている⁶²⁾。そのため他のリポ蛋白と同様、HDLは形態、構造、大きさ等が不均一で、構成する各脂質・蛋白も連続的に変化したリポ蛋白の集合と考えられる。このpolydispersity、heterogeneityが従来の超遠心法により分類されたリポ蛋白の概念(すなわちVLDL、LDL、HDL等)のみでは、リポ蛋白代謝の本態を理解するには不十分であることを示し、またリポ蛋白代謝研究上の混乱を招く原因となっていた。しかし、Alaupovicらはリポ蛋白の構造および機能を規定するものは各リポ蛋白中のアポ蛋白であるとして、リポ蛋白中の各アポ蛋白を純化し、その機能面および構造等より、Apo A、B、C、D、E、と命名した⁶³⁾⁶⁸⁾。最近、さらにHDL中よりApo Fが、Oloffsonらにより分離報告されている⁶⁹⁾。この分類の論理性はApo A-Iがlecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)を活性化させる機能⁷⁰⁾⁷¹⁾を有

し、Apo C-I, C-II が lipoprotein lipase (LPL) を活性化し^{72)~77)}、逆に Apo C-III⁷⁸⁾、Apo E⁷⁹⁾ が LPL 活性を抑制する等多くの実験的事実より裏付けられている。そのため、リポ蛋白代謝の研究には Alaupovic らの提唱する family concept の概念に基づき進められる事が望ましいと考えられ、著者もこの考え方に基づいて実験を行ない、考察した。

3) ラット培養肝細胞の HDL₃ または Apo A-I の合成について

抗ラット Apo A-I 血清と 20 時間成熟ラット肝細胞を培養した培養液との間に明瞭な免疫沈降線が免疫電気泳動法および免疫拡散法により確認された。

また肝細胞を 20 時間培養した培養液から超遠心法にて分離した Apo HDL₃ を PAGE にて分析し、対照のラット血清 Apo HDL₃ と比較すると、ほぼ移動度の等しい HDL₃ ペプチド泳動帯 (主として Apo A-I, Apo C) が観察された。

以上の結果から著者は成熟ラットの初代培養肝細胞により HDL₃ または Apo A-I が合成分泌されている事を証明した。

HDL の合成については、Marsh および¹⁶⁾ Felker らが¹⁸⁾ラット肝灌流法を利用し肝での HDL 合成を報告している。しかし、彼らによると灌流液中に分泌された HDL 中のアポ蛋白の組成は血漿 HDL 中のアポ蛋白の組成とは異なり、Apo E が主でむしろ Apo A-I は極めてわずかであるとしている。これに対して、Noel らの同様の肝灌流実験で¹⁴C-Valine のアポ蛋白への取り込みを検討した報告⁷⁾では、Apo A-I への取り込みが Apo E への取り込みより多いと報告しておりさらに同様の肝灌流を利用し、放射性アミノ酸の Apo A-I および Apo E への取り込みには殆ど差がないとする Windmueller らの報告等⁵⁾、現在結論の一致をみていない。また、Nakaya らはブタ肝灌流実験により、灌流液中の密度 $d > 1.210$ g/ml 分画中に Apo A-I が多く存在する事を報告し、アポ蛋白の分離過程で人工的に遊離した可能性を示唆している⁹⁾。

一方、腸管により合成された Apo A-I に関してもその存在する分画が主に $d < 1.006$ g/ml とする Imaizumi らの報告⁸⁰⁾に対して、逆に $d > 1.063$ g/ml に存在するとする Glickman らの対立する報告がある⁸¹⁾。これらの腸で合成される Apo A-I と、肝で合成される Apo A-I との代謝関係や、量的関係については現在まったく不明である。また、HDL、VLDL 中の Apo C に関しては、現在腸管での合成は否定的で、むしろ肝で合成されると考えられている⁵⁾。しかし、肝で合成された Apo C は VLDL として分泌されるのか、

HDL として分泌されるのか、さらに分泌された Apo C がどのようにして腸管で VLDL ないし chylomicron 分画に組み込まれるのか不明な点が多い。

著者も、肝細胞培養液の Apo HDL₃ の PAGE 分析で、明瞭な Apo C と推定される泳動帯を認め、肝で Apo C が合成され、HDL として肝より合成分泌される事を確認した。しかし、肝で合成された HDL 中の Apo C と Apo A-I との量的関係は泳動帯の染色性より推察して相対的にラット血清 HDL₃ のそれに比して Apo C が多いと考えられたが、この点については更に検討が必要と考えられた。

4) 抗ラット HDL₃ 血清について

ラット血清 HDL₃ を家兎に免疫し得られた抗血清は、抗原として用いた HDL₃ の蛋白は Apo A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E 等より構成されている^{83)~86)}ため個々のアポ蛋白に対する抗体を有しているのではないかという疑問が残る。しかし、今回使用した抗ラット HDL₃ 血清は VLDL, LDL との間に免疫反応が認められず、Apo B に対する抗体をもたないこと、Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーで分離した peak I, III に含まれる Apo E, Apo A-II, Apo D, Apo C との間に免疫反応を示さないこと、peak II の Apo A-I に対してのみ免疫沈降線が形成された事実より、Apo A-I に対する特異的抗血清と考えられた。

リポ蛋白中のアポ蛋白は脂質により一部覆われており、また抗原としてのアポ蛋白量にも差があるため、抗原として使用した HDL₃ 中のすべてのアポ蛋白に対して、均等に抗体が産生されるわけではない。また、脱脂したリポ蛋白 (すなわちアポ蛋白) と、無処理のリポ蛋白を家兎に免疫した場合、産生される抗体の特異性に差があることも報告⁸²⁾されている。

この抗ラット HDL₃ 血清と濃縮した培養液との間に形成された沈降線と、対照のラット血清 HDL₃ との沈降線の移動度とが一致しなかった点については、肝細胞により合成されたリポ蛋白 A の電氣的荷電の差、いかえれば合成されたリポ蛋白の構造ないし組成上の差のためと考えられた。

ラット遊離肝細胞を用い⁸³⁾、また、ニワトリの肝細胞培養を用いて VLDL の合成を検討した報告⁸⁴⁾はあるが、現在まで、培養肝細胞を利用し HDL の合成についての報告は著者の成績が最初の報告である。このような培養肝細胞を利用したリポ蛋白代謝の実験系は各種の薬物やホルモンの影響を検討する上で極めて有利な実験系と考えられた。

結 語

1. 初代成熟ラット肝細胞の無血清培養液を用いた単層培養法を確立し、形態学および代謝学的に検討を加えた。培養24～48時間迄の培養肝細胞はグルコース合成能、ステロイドによるTAT誘導、アルブミン合成等の特異的肝機能や細胞膜機能を十分維持している事が確認された。

2. ラット肝細胞によるHDL₃ないしApo A-Iの合成が確認された。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を頂いた中井継彦助手に心から感謝致します。併せて、本研究遂行に際し、御協力いただいた第2内科第6研究室、玉井利孝、小林武嗣、林多喜王、久津見恭典諸兄ならびに、Oklahoma Medical Research FoundationのDr. Thomas F. Whayne, Jr., Mrs. Patricia S. Otto, およびMrs. Diana L. Kennedyに厚く御礼申し上げます。

(本研究の一部は、American Heart Association Oklahoma Affiliateの援助によりOklahoma Medical Research Foundationで行なった。)

文 献

- 1) Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T. & McNamara, P. M. : Serum cholesterol lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann. Intern. Med.*, **74**, 1-12 (1971).
- 2) Gofman, J. W., Young, W. & Tandy, R. : Ischemic heart disease, atherosclerosis and longevity. *Circulation*, **34**, 679-697 (1966).
- 3) Miller, G. J. & Miller, N. E. : Plasma-high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet*, **1**, 16-19 (1975).
- 4) Radding, C. M., Bragdon, J. H. & Steinberg, D. : The synthesis of low and high-density lipoproteins by rat liver in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 443-444 (1958).
- 5) Windmueller, H. G., Herbert, P. N. & Levy, R. I. : Biosynthesis of lymph and plasma lipoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J. Lipid Res.*, **14**, 215-223 (1973).
- 6) Marsh, J. B. : Apolipoproteins of the lipoproteins in a nonrecirculating perfusate of rat liver. *J. Lipid Res.*, **17**, 85-90 (1976).
- 7) Noel, S. P. & Rubinstein, D. : Secretion of apolipoproteins in very low density and high density lipoproteins by perfused rat liver. *J. Lipid Res.*, **15**, 301-308 (1974).
- 8) Felker, T. E., Fainaru, M., Hamilton, R. L. & Havel, R. J. : Secretion of the arginine-rich and A-I apolipoproteins by the isolated perfused rat liver. *J. Lipid Res.*, **18**, 465-474 (1977).
- 9) Nakaya, M., Chung, B. H. & Taunton, O. D. : Synthesis of plasma lipoproteins by the isolated perfused liver from the fasted and fed pig. *J. Biol. Chem.*, **252**, 5258-5261 (1977).
- 10) Berkel, T. J. C. V., Tol, A. V. & Kostner, J. F. : Iodine labeled human and rat low-density and high-density lipoprotein degradation by human liver and parenchymal and nonparenchymal cells from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 138-146 (1978).
- 11) Eisenberg, S., Windmueller, H. G. & Levy, R. I. : Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J. Lipid Res.*, **14**, 446-458 (1973).
- 12) Berry, M. N. & Friend, D. S. : High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A Biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, **43**, 506-520 (1969).
- 13) Nakai, T., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Wheyner Jr., T. F. : Rat high density lipoprotein subfraction (HDL₃) uptake and catabolism by isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4914-4921 (1976).
- 14) Lin, R. C. & Snodgrass, P. J. : Primary culture of normal adult rat liver cells which maintain stable urea cycle enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 725-734 (1975).
- 15) Slein, M. W. : D-Glucose : Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, p117-123, In Bergmeyer, H.-U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie Academic Press, New York, 1965.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randell, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 17) Spencer, C. J. & Gelehrter, T. D. : Pseudo-isoenzymes of hepatic tyrosine aminotransferase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 577-583 (1974).

- 18) Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. & Potter, V. R. : Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3014-3020 (1976).
- 19) Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. & Potter, V. R. : A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Biochemistry.*, **68**, 537-544 (1975).
- 20) Laurell, C. G. : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, **15**, 45-52 (1966).
- 21) Curry, M. D., McConathy, W. J., Alaupovic, P., Ledford, J. H. & Popovic, M. : Determination of human apolipoprotein E by electroimmunoassay. *Biochim. Biophys. Acta*, **439**, 413-425 (1976).
- 22) Scanu, A. : Forms of human serum high density lipoprotein protein. *J. Lipid Res.*, **7**, 295-306 (1966).
- 23) Alaupovic, P., Lee, D. M. & McConathy, W. J. : Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins : Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 689-707 (1972).
- 24) Davis, B. J. : Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 25) Chajek, T., Friedman, G., Stein, O. & Stein, Y. : Effect of colchicine, cycloheximide and chloroquine on the hepatic triacylglycerol hydrolase in the intact rat and perfused liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 270-279 (1977).
- 26) Argilaga, C. S. & Heimberg, M. : Comparison of metabolism of free fatty acid by isolated perfused livers from male and female rats. *J. Lipid Res.*, **17**, 605-615 (1976).
- 27) Tews, J. K. & Harper, A. E. : Transport of nonmetabolizable amino acids in rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 601-610 (1969).
- 28) Edmondson, J. D., Lumeng, L. & Li, T. K. : Direct measurement of active transport systems for alanine. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 751-757 (1977).
- 29) Baur, H., Kasperek, S. & Pfaff, E. : Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 827-838 (1975).
- 30) Gey, G. O. : An improved technique for massive tissue culture. *Am. J. Cancer*, **17**, 752-756 (1932).
- 31) Chang, R. S. : Continuous subcultivation of epithelial cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **87**, 440-443 (1954).
- 32) Rijn, H. V., Bevers, M. M., Wijk, V. R. & Wicks, W. O. : Regulation of phosphoenol pyruvate carboxylase and tyrosine transaminase in hepatoma cell cultures. III. Comparative studies in H35, HTC, MH₁C₁ and RLC cells. *J. Cell Biol.*, **60**, 181-191 (1974).
- 33) Perske, W. F., Parks Jr, R. E. & Walker, D. L. : Metabolic differences between hepatic parenchymal cells and a cultured cell line from liver. *Science*, **125**, 1290-1291 (1957).
- 34) Leffert, H. L. & Sells, S. : Alpha₁fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. *J. Cell Biol.*, **61**, 823-829 (1974).
- 35) Jeejeebhoy, K. N., Robertson, A. B., Ho, J. & Sodke, U. : The effect of cortisol on rat plasma albumin, fibrinogen and transferrin. *Biochem. J.*, **130**, 533-538 (1972).
- 36) 黒木登志夫 : 細胞の癌化, p321-359. 細胞生物学 7. 細胞の分化 (小川, 木村, 村松, 堀川編) 理工学社, 東京, 1977.
- 37) Phillips, M. J., Oda, M., Edwards, V. D., Greenberg, G. R. & Jeejeebhoy, K. N. : Ultrastructural and functional studies of cultured hepatocytes. *Lab. Invest.*, **31**, 533-542 (1974).
- 38) Bonney, R. J., Becker, J. E., Walker P. R. & Potter, V. R. : Primary monolayers of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. *In Vitro*, **9**, 399-413 (1974).
- 39) Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Meyer, V. A. : Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Func-

- tional studies. *J. Cell Biol.*, **59**, 722-734 (1973).
- 40) Laishes, B. A. & Williams, G. : Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. I. The effect of insulin. *In Vitro*, **12**, 521-532 (1976).
- 41) Yamada, S., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whayne Jr., T. F. : The effects of dexamethasone on metabolic activity hepatocytes in primary monolayer culture. *In Vitro*, In press.
- 42) Michalopoulos, G. & Pitot, H. C. : Primary culture of parenchymal liver cells on a collagen membrane. *Exp. Cell Res.*, **84**, 70-78 (1975).
- 43) Morrison, S. J. & Jenkin, H. M. : Growth of chlamydia psittaci strain meningopneumonitis in mouse L cells cultivated in a defined medium in spinner cultures. *In Vitro*, **8**, 94-100 (1972).
- 44) Leibovitz, A. : The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Amer. J. Hyg.*, **78**, 173-180 (1963).
- 45) Ham, R. G. : Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 288-293 (1965).
- 46) Chapman, G. S., Jones, A. L., Meyer, U. A. & Bissell, D. M. : Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. II. Ultrastructural studies. *J. Cell Biol.*, **59**, 735-747 (1973).
- 47) Cam, A. L. & Freychet, P. : Glucagon stimulates the A-system for neutral amino acid transport in isolated hepatocytes of adult rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 893-901 (1976).
- 48) Chambers, J. W., George, R. H. & Bass, A. D. : Effect of hydrocortisone and insulin on uptake of α -amino-isobutyric acid by isolated perfused rat liver. *Mol. Pharm.*, **1**, 66-76 (1965).
- 49) Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. & Potter, V. R. : A "permissive" effect of dexamethasone on the glucagon induction of amino acid transport in cultured hepatocytes. *Nature*, **256**, 46-47 (1975).
- 50) Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : The Framingham study. *Amer. J. Med.*, **62**, 707-714 (1977).
- 51) Miller, N. E., Førde, O. H., Thelle, D. S., & Mjøs, O. D. : The Tromsø heart study, high density lipoproteins and coronary heart disease ; A prospective case-control study. *Lancet*, **1**, 965-967 (1977).
- 52) Nichols, A. V. : Human serum lipoproteins and their interrelationships. *Advanc. Biol. Med. Phys.*, **11**, 109 (1967).
- 53) Glueck, C. J., Fallat, R. W., Millett, F., Gartside, P., Elston, R. C. & Go, R. C. P. : Familial hyper- α -lipoproteinemia : Studies in eighteen kindreds. *Metabolism*, **24**, 1243-1265 (1975).
- 54) Avogaro, P. & Gazzolato, G. : Familial hyper-HDL(α)-cholesterolemia. *Atherosclerosis*, **22**, 63-77 (1975).
- 55) Garew, T. E., Koschinsky, T., Hayes, S. B. & Steinberg, D. : A mechanism by which high-density lipoproteins may slow the atherogenic process. *Lancet*, **1**, 1315-1317 (1976).
- 56) Miller, N. E., Weinstein, D. B., Carew, T. E., Koschinsky, T. & Steinberg, D. : Interaction between high density and low density lipoproteins during uptake and degradation by cultured human fibroblast. *J. Clin. Invest.*, **60**, 78-88 (1977).
- 57) Bondjers, G. & Björkerud, S. : Cholesterol transfer in vitro between the rabbit aorta and serum lipoproteins. p110-113, In G. Schettler & A. Weizel (ed.), *Atherosclerosis (III)* Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- 58) Nakai, T., Otto, P. S. & Whayne Jr., T. F. : Proteolysis of canine apolipoprotein by acid proteases in canine liver lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 380-389 (1976).
- 59) Nakai, T. & Whayne Jr., T. F. : Catabolism of canine apolipoprotein A-I : Purification, catabolic rate, organs of catabolism and the liver subcellular catabolic site. *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 68-80 (1976).
- 60) Skipski, V. P. : Quantitation, composition and metabolism, p471-583, In *Blood lipids and lipoproteins*, Wiley-Interscience, New York, 1972.

- 61) Freeman, N. K., Lindgren, F. T. & Nichols, A. V. : The chemistry of serum lipoproteins. *Progr. Chem. Fats Other Lipids*, **6**, 215 - 250 (1963).
- 62) Lindgren, F. T., Freeman, N. K. & Ewing, A. M. : Ultra-centrifugal analysis of serum lipoproteins. *Progr. Biochem. Pharm.*, **2**, 475 - 499 (1967).
- 63) Scanu, A., Toth, J., Edelstein, C., Koga, S. & Stiller, E. : Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions. Evidence for polypeptide heterogeneity. *Biochemistry.*, **8**, 3309 - 3316 (1969).
- 64) Shore, B. & Shore, V. : Isolation and characterization of polypeptides of human serum lipoproteins. *Biochemistry.*, **8**, 4510 - 4516 (1969).
- 65) Borut, T. C. & Aladjem, F. : Immunochemical heterogeneity of human high density serum lipoproteins. *Immunochemistry*, **8**, 851 - 863 (1974).
- 66) Kostner, G. M., Patsch, J. R., Sailer, S., Braunsteiner, H. & Holasek, A. : Polypeptide distribution of main lipoprotein density classes separated from human plasma by rate zonal ultracentrifugation. *Eur. J. Biochem.*, **15**, 611 - 621 (1974).
- 67) Fainaru, M., Havel, R. J. & Imaizumi, K. : Apolipoprotein content of plasma lipoproteins of the rat separated by gel chromatography or ultracentrifugation. *Biochem. Med.*, **17**, 347 - 355 (1977).
- 68) McConathy, W. J. & Alaupovic, P. : Isolation and partial characterization of apolipoprotein D. A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **37**, 178 - 182 (1973).
- 69) Olafsson, S. O., McConathy, W. J. & Alaupovic, P. : Isolation and partial characterization of a new acidic apolipoprotein (apolipoprotein F) from high density lipoproteins of human plasma. *Biochemistry.*, **17**, 1032 - 1036 (1978).
- 70) Soutar, A., Garner, C., Baker, H. N., Sparrow, J. T., Jackson, R. L., Gotto, A. M. & Smith, L. C. : The effects of plasma apolipoproteins on lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.*, **14**, 3057 - 3064 (1975).
- 71) Fielding, C. J., Shore, V. C. & Fielding, P. E. : A protein cofactor of lecithin : cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1493 - 1498 (1972).
- 72) Ganesan, D. & Bass, H. B. : Isolation of C-I and C-II activated lipoprotein lipases and protamine insensitive triglyceride lipase by heparin Sepharose affinity chromatography. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **53**, 1 - 4 (1975).
- 73) Ganesan, D. & Bradford, R. H. : Isolation of apolipoprotein-free lipoprotein lipase from human postheparin plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 544 - 549 (1971).
- 74) La Rosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, R., Luxe, S. E. & Fredrickson, D. S. : A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 57 - 62 (1970).
- 75) Havel, R. J., Shore, V. G., Shore, B. & Bier, D. M. : Role of specific glycopeptides of human serum lipoprotein in the activation of lipoprotein lipase. *Circulation Res.*, **27**, 595 - 600 (1970).
- 76) Havel, R. J., Fielding, C. J., Olivercrona, T., Shore, V. G., Fielding, P. E. & Egelrud, T. : Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. *Biochemistry*, **12**, 828 - 833 (1973).
- 77) Bier, D. M. & Havel, R. J. : Activation of lipoprotein lipase by lipoprotein fractions of human serum. *J. Lipid. Res.*, **11**, 565 - 570 (1970).
- 78) Brown, W. V. & Baginsky, M. L. : Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 375 - 381 (1972).
- 79) Ganesan, D., Bass, H. B., McConathy, W. J. & Alaupovic, P. : Is decreased activity of C-II activated lipoprotein lipase in type III hyperlipoproteinemia (broad- β -disease) : A cause or an effect of increased apolipoprotein E levels? *Metabolism*, **25**, 1189 - 1195 (1976).

- 80) 今泉勝己 & Havel, R. J. : ラット腸管リンパの Apo A-IとARPの輸送と起源. 脂質生化学研究, 20, 113-116 (1978).
- 81) Glickman, R. M. & Green, P. H. R. : The intestine as a source of apolipoprotein A-I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 2569-2573 (1977).
- 82) Koga, S., Horwitz, D. L. & Scann, A. M. : Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. J. Lipid Res., 10, 577-588 (1969).
- 83) Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Breckenridge, C., B-Robertson, A., Steiner, G. & Jeejeebhoy, J. : Synthesis of VLDL by isolated rat hepatocytes in suspension. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 1147-1153 (1975).
- 84) Tarlow, D. M., Watkins, D. A., Reed, R. E., Miller, R. S., Zwergel, E. E. & Lane, M. D. : Lipogenesis and the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by avian liver cells in nonproliferating monolayer culture. Hormonal effects. J. Cell Biol., 73, 332-353 (1977).

A b s t r a c t

It is indicated that the liver plays an important role in lipoprotein metabolism. Recently the relationship between low plasma concentrations of high density lipoprotein (HDL) and coronary heart disease has been reported. The purpose of the present study was to investigate lipoprotein synthesis, especially HDL₃ or Apo A-I, using a primary culture system of rat liver parenchymal cells. The cell culture system has several advantages such as cell homogeneity and the possibility of longer incubation than the liver perfusion system that has been used by other investigators.

Isolation of rat liver parenchymal cells was performed according to the method of Berry and Friend with some modifications. Isolated hepatocytes (approximately 3.0 millions cells) in 2.5 ml of serum free culture media, HI/WO₅/BA₂₀₀₀, were inoculated in tissue culture dishes. These dishes were placed in a humidified incubator at 37°C under 5% CO₂/95% air. All procedures for isolation and culture of liver cells were carried out under aseptic conditions.

Metabolic functions of cultured hepatocytes 24 hours postinoculation were summarized as follows : 1. Gluconeogenesis from 1mM pyruvate and 10 mM lactate was 179.5 nmoles/mg cell protein/hour. 2. Induction of tyrosine aminotransferase activity (TAT) by dexamethasone was 43.8 mU/mg cell protein. This enzyme activity was assayed by the method of Spencer and Gelharter. 3. To evaluate the integrity of the plasma membrane, membrane transport of nonmetabolizable amino acid was studied. The distribution ratio of ¹⁴C- α -aminoisobutyric acid (AIB) was 9.5. 4. Albumin synthesis by liver parenchymal cells was 1.56 μ g/mg cell protein/hour. Albumin was measured by quantitative electroimmunoassay according to the Laurell's method.

And also, morphological examination by light and electron microscope showed that integrity cultured cells was maintained in serum free culture media, HI/WO₅/BA₂₀₀₀, at least 24 hours after cell inoculation.

Rat HDL₃ (1.110 < d < 1.210 g/ml) was isolated by sequential ultracentrifugation. Anti-rat HDL₃ serum was prepared by immunizing rabbits with repeated intraperitoneal injections of equal volumes of rat HDL₃ and Freund's complete adjuvant. Anti-rat HDL₃ reacted only with HDL₃, did not react with very low density lipoprotein (VLDL : d <

1.006 g/ml) and low density lipoprotein (LDL₂ : 1.019 < d < 1.050 g/ml). Totally delipidized rat HDL₃, Apo HDL₃, was analyzed by column chromatography of Sephadex G-100 in 0.01 M Tris buffer, pH 8.0 with 8 M urea. Apo HDL₃ was separated into three peaks, peak I, II and III. Anti-rat HDL₃ reacted with peak II (mainly containing Apo A-I) and did not react with peak I and peak III which contained Apo A-II, C, D, and E. Therefore, this anti-rat HDL₃ had the monospecific antigenicity against Apo A-I.

The pooled culture media in which rat liver parenchymal cells were cultured for 20 hours were concentrated approximately 10 times by ultrafiltration. Single precipitin line was observed by immunodiffusion and immunoelectrophoresis between anti-rat HDL₃ serum (anti-rat Apo A-I) and concentrated culture media. HDL₃ was fractionated from pooled culture media by ultracentrifugation. Total delipidized HDL₃ fractions were analyzed by 7% PAGE with 8 M urea. Apo A-I and Apo C peptides were observed on PAGE, and the PAGE pattern of Apo HDL₃ from culture media was identical to the pattern of rat serum Apo HDL₃.

This culture system of rat liver parenchymal cells can be utilized for the study of rat lipoproteins metabolism and possible regulation by hormones and other agents.
